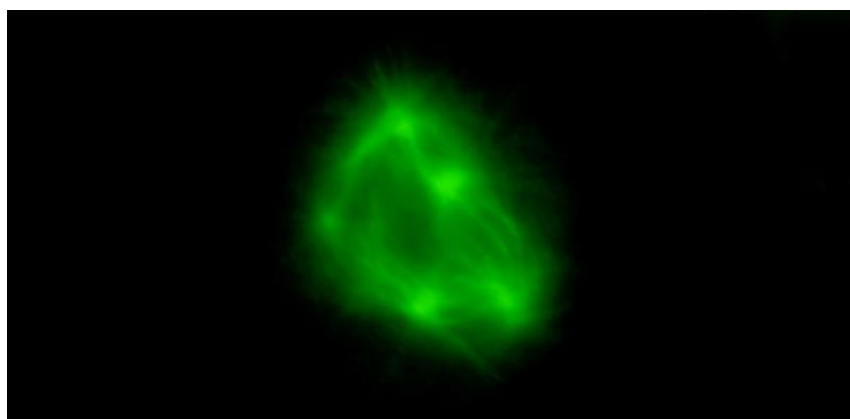


ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA TRIM37 EN LA FERTILIDAD Y LA TUMORIGÉNESIS UTILIZANDO EL RATÓN COMO MODELO



Alumna: Yolanda Áurea García Salamanca

Tutora: Elena Llano Cuadra

Facultad de medicina. Grado en medicina

Trabajo de fin de grado

Año 2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN.....	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
1. Estudio de testículos de ratón	9
2. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.....	9
3. Genotipado de los embriones de ratón	10
4. Cultivos celulares y condiciones de cultivo	10
5. Inmunofluorescencia	11
RESULTADOS	12
1. Estudio de la fertilidad masculina en ratones nulos para TRIM37.....	12
2. Determinación de la posible implicación de TRIM37 en el correcto desarrollo de la mitosis celular, mediante el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón. ...	18
DISCUSIÓN.....	22
1. Estudio de la fertilidad masculina en ratones nulos para TRIM37.....	22
2. Determinación de la posible implicación de TRIM37 en el correcto desarrollo de la mitosis celular, mediante el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón. ...	24
CONLCUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXO.....	29

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

pb: Par de bases (base pair).

CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

dNTP: Desoxiribonucleótido trifosfato (deoxyribonucleotide triphosphate)

Dpc: Días post coito.

Dpp: Días post parto.

EX,5: X,5 días de desarrollo embrionario.

FBS: Suero fetal bovino (fetal bovine serum).

FSH: Hormona folículo estimulante (follicle-stimulating hormone).

LH: Hormona luteinizante (luteinizing hormone).

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (mouse embryonic fibroblasts).

PBS: Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction).

PSG: Penicilina-estreptomicina-glutamina (Penicillin-Streptomycin-Glutamine).

PX: X días posparto.

rpm: Revoluciones por minuto.

sgRNA: Guía sintética de ARN (synthetic guide RNA).

TRIM: Motivo tripartito (tripartite motif).

UTR: Región sin traducir (untranslated region).

RESUMEN

TRIM37 es un gen que se encuentra en el cromosoma 17q22-23 y que codifica una proteína del mismo nombre con actividad E3-ubiquitin ligasa. Se han descrito diversas mutaciones en TRIM37 asociadas con el desarrollo de una enfermedad rara autosómica recesiva denominada *mulibrey nanism*, una enfermedad multiorgánica que se caracteriza por un retraso severo en el crecimiento, infertilidad, cardiopatías y una mayor incidencia tumoral. Todas las mutaciones descritas en TRIM37 en estos pacientes conllevan una pérdida de función de la proteína. A pesar de la aparente relevancia de la misma durante las primeras etapas del desarrollo, la maduración sexual, la fertilidad y la tumorigénesis, actualmente aún se desconoce cuál es la función in vivo de TRIM37. Con el fin de determinar el papel que desempeña esta proteína a nivel fisiológico así como su implicación en el desarrollo de la infertilidad y la tumorigénesis, decidimos generar un modelo de ratón nulo para TRIM37. Los resultados obtenidos en el estudio, demostraron en los ratones macho TRIM37^{-/-} la presencia de hipoplasia testicular con degeneración de los túbulos seminíferos y azoospermia. Además, se ha puesto de manifiesto el posible papel de esta proteína en el correcto desarrollo del huso acromático durante la división celular, al constatar la presencia de un mayor número de husos multipolares en aquellos MEFs nulos para TRIM37 en relación con los heterocigotos.

INTRODUCCIÓN

TRIM37 es un gen que se encuentra localizado en el cromosoma 17q22-23 [1-3], y que codifica una proteína del mismo nombre, perteneciente a la familia de proteínas con motivo tripartito (*TRIM*) [1,2,4,5] y a la subfamilia de dedos de zinc [1]. El motivo tripartito se encuentra en la región N-terminal y está formado por un dominio RING, un dominio B-box y una región coiled-coil [1,2,4,5]. TRIM37 está presente en la mayoría de los tejidos humanos analizados [1,4,6] con una mayor expresión en cerebro y testículos [6]. En cuanto a su localización subcelular, se ha descrito que TRIM37 se puede detectar en el interior de los peroxisomas [1-4,7] en el núcleo y formando agregados perinucleares en células en cultivo [8].

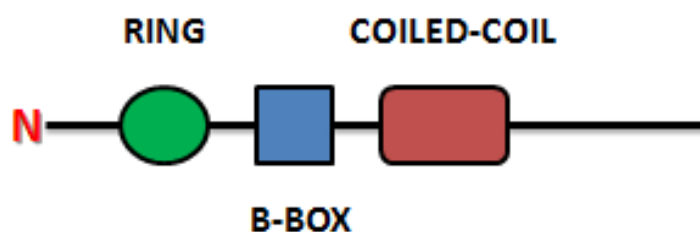


Figura 1. Representación esquemática del motivo tripartito de TRIM37. El motivo tripartito se encuentra en la región N-terminal y está formado por un dominio RING, un dominio B-box y una región coiled-coil.

Se ha comprobado que la proteína TRIM37 es capaz de actuar como una E3 ubiquitin ligasa [2-5,9]. Estos enzimas pertenecen al denominado sistema de ubiquitinas, encargado del proceso denominado ubiquitinación de proteínas, una modificación postrasduccional en la que intervienen enzimas específicas cuyo objetivo es la unión de una o varias moléculas de ubiquitina a la proteína diana con la finalidad de regular diversas rutas de señalización a nivel celular y de marcar determinados sustratos para su degradación en el proteosoma. El proceso se inicia con la *enzima E1 activadora* que tiene la capacidad de unirse covalentemente a una molécula de ubiquitina; posteriormente la *enzima E2 de conjugación* media la transferencia de dicha molécula desde E1 a sí misma y, por último, *E3 ubiquitin ligasa* sería la encargada de transferir la ubiquitina desde E2 hasta la proteína diana [10].

Debido al gran número de subtipos de E3 ligasa conocidos, se cree que es ésta enzima la que determina la especificidad del sustrato al que se van a unir las moléculas de Ubiquitina [10]. El sustrato de TRIM37 es desconocido en la actualidad, pero se cree que su función podría estar implicada en la regulación de varios procesos celulares y en el marcaje de diversas proteínas para su degradación en el proteosoma [2,4].

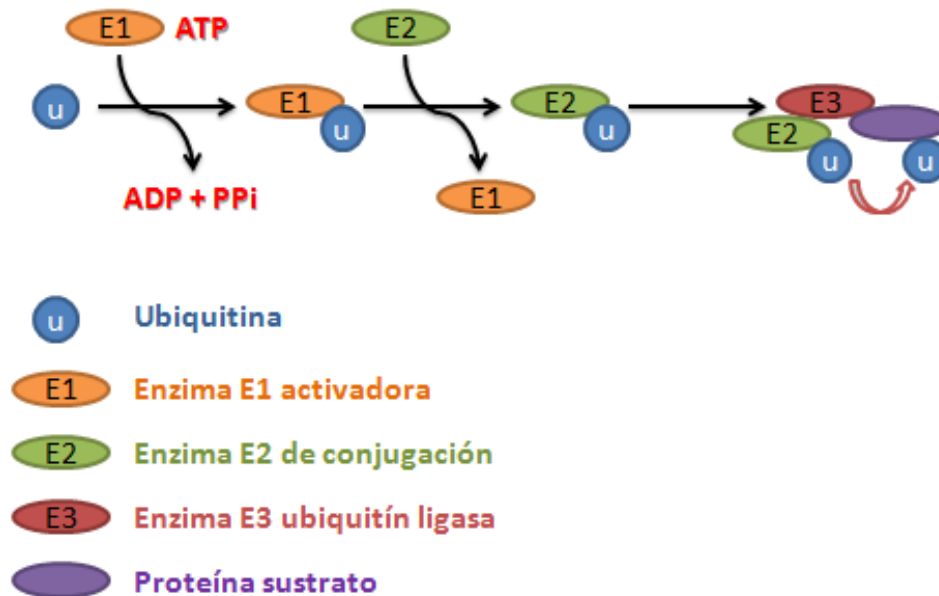


Figura 2. Representación esquemática del proceso de ubiquitinación.

Se han descrito diversas mutaciones en el gen TRIM37 que están asociadas con el desarrollo de una enfermedad rara denominada **mulibrey nanism** (OMIM 253250) [1-5]. Se trata de una enfermedad monogénica autosómica recesiva [1-4] caracterizada por un fallo severo en el crecimiento y múltiples manifestaciones orgánicas [1-5] que fue descrita por primera vez en Finlandia a principios de 1970 [1]. Todas las mutaciones descritas hasta el momento en el gen TRIM37 parecen dar lugar a alelos nulos y, por tanto, a proteínas no funcionales [2].

El acrónimo **mulibrey** (*muscle-liver-brain-eye*) [1,3,4] hace referencia a algunas de las características clínicas que presentan estos pacientes: Hipotonía muscular, hepatomegalia, dilatación de los ventrículos cerebrales y cisternas basales y pigmentación anormal de la retina [1]. Por otra parte, el término **nanism** está relacionado con el retraso en el crecimiento observado ya desde el periodo prenatal, que está presente en prácticamente la totalidad de los casos estudiados [1-5].

La mayor parte de estos pacientes también cursan con problemas respiratorios, trastornos de la deglución, infecciones de repetición, signos de enfermedad cardíaca, nevus flammeus, resistencia a la insulina y síndrome metabólico, alteraciones en el tono de la voz y una mayor frecuencia en el desarrollo de tumores malignos y benignos en múltiples órganos, así como alteraciones vasculares y trastornos en el desarrollo orgánico, probablemente asociado a un defecto de la migración celular durante el desarrollo embrionario. A pesar de todo ello, se ha observado que el desarrollo psicomotor es normal en la mayoría de los pacientes estudiados [1-4].

Investigaciones realizadas han revelado que la afectación cardíaca, especialmente debida al desarrollo de pericarditis constrictiva y miocardiopatía, es la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Esto va a dar lugar, en el 50% de los casos, a una disminución de la esperanza de vida debido al desarrollo de fallo cardíaco congestivo antes de alcanzar la edad adulta [3].

Además, durante el seguimiento clínico realizado a estos pacientes, se ha puesto de manifiesto que todos ellos presentan fallos en la maduración sexual e infertilidad [2,7].

La infertilidad es un problema creciente, que afecta aproximadamente a 15% de las parejas en todo el mundo. Aunque existen algunos trastornos de infertilidad que están asociados con síndromes genéticos bien definidos, casi una cuarta parte de los casos clínicos en ambos sexos son de naturaleza desconocida, en parte debido al escaso conocimiento que se tiene sobre los mecanismos básicos que regulan la fertilidad. Por tanto, no es sorprendente que el diagnóstico de infertilidad idiopática sea el más común en la clínica diaria [2, 11, 12].

En el caso de las mujeres que portan mutaciones en TRIM37, se ha observado que todas ellas inician la pubertad con desarrollo normal de la menarquía, sin embargo, al poco tiempo tienden a presentar irregularidades que oscilan entre oligomenorrea y amenorrea, con episodios de metrorragia, dando lugar a un fallo ovárico prematuro y, por tanto, a infertilidad. En estas pacientes se ha observado un pobre desarrollo mamario, ovario y útero pequeños, la aparición de fibrotecomas ováricos y niveles de gonadotropinas elevados [7].

Por otra parte, los varones con mutaciones en TRIM37 presentan un fenotipo genital externo normal, pero con testículos reducidos de tamaño. Al igual que en las mujeres, el inicio de la pubertad se desarrolla con normalidad, con niveles de FSH, LH, testosterona e inhibina B normales. Sin embargo, poco tiempo después, el desarrollo del crecimiento testicular y la virilización se ven enlentecidos, acompañado de un incremento progresivo de FSH y LH, descenso de los niveles de inhibina B y el mantenimiento de los niveles de testosterona. Las muestras de semen de estos pacientes revelan una oligoastenozoospermia o azoospermia. Todo ello conduce a un hipogonadismo hipergonadotrópico, que cursa con infertilidad. Aunque es más infrecuente, también se ha descrito algún caso de tecoma testicular [2].

Estos estudios sugieren, por tanto, que TRIM37 es un nuevo gen candidato de infertilidad tanto masculina como femenina [2,7].

Recientemente se ha descrito que la región 17q23, dentro de la cual se localiza TRIM37, esta amplificada en aproximadamente el 40% de los tumores de mama y que líneas celulares de tumores de mama que tienen amplificada esta región también presentan sobreexpresión de TRIM37. La disminución de los niveles de esta proteína mediante ARN de interferencia en estas líneas celulares disminuye sustancialmente el crecimiento tumoral en xenoinjertos de ratón. Por el contrario, la expresión ectópica de TRIM37 es capaz de convertir en tumorigénicas células no transformadas. Estos resultados presentan a TRIM37 como una nueva oncoproteína implicada en el desarrollo de tumores de mama [9].

Por otra parte, se ha descrito que, en líneas celulares humanas, TRIM37 puede prevenir la reduplicación de los centriolos durante la división celular, evitando así la aparición de centriolos supernumerarios que den lugar a husos multipolares y el consecuente reparto anómalo de cromosomas entre las dos células hijas [5].

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la aparente relevancia de esta proteína durante las primeras etapas del desarrollo, la maduración sexual, la fertilidad y la tumorigénesis, actualmente aún se desconoce cuál es la función in vivo de TRIM37, así como los mecanismos patogénicos que dan lugar a la enfermedad *mulibrey nanism*, aunque se postula la pérdida de función de la E3 ubiquitin ligasa, como consecuencia de la mutación en el gen, como una de las posibles causas implicadas en el desarrollo de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta todo esto y empleando un modelo murino nulo para TRIM37 decidimos abordar el estudio de la función/es de esta proteína a nivel fisiológico así como su implicación en el desarrollo de las distintas patologías descritas anteriormente.

OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de este plan general de determinar la función in vivo de TRIM37 y su relevancia en el desarrollo del *mulibrey nanism* centrándonos principalmente en los procesos de infertilidad y desarrollo tumoral.

En base a ello, los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Estudio de la fertilidad masculina en ratones nulos para TRIM37 (TRIM37^{-/-}).
2. Determinación de la posible implicación de TRIM37 en el correcto desarrollo de la mitosis celular, mediante el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estudio de testículos de ratón.

Se procedió a sacrificar a los ratones con CO₂ y posteriormente se practicó una disección para la extracción testicular. Una vez obtenidos los testículos, se pesaron en una balanza.

- Análisis histológico de testículos

Uno de los testículos, fue fijado con Bouin y se empleó para realizar una tinción histológica con hematoxilina-eosina.

- Esparcido de espermatozoides

Sobre el testículo restante se realizó la técnica del esparcido de espermatozoides (*surface spreading*). Para ello, se eliminó la túnica albugínea y tras depositar el testículo sobre una placa de petri junto con PBS, se procedió a la trituración del mismo empleando para ello un bisturí. De esta manera se obtuvieron células de la espermatogénesis, que fueron recogidas en un tubo de 15 mL, al que se añadió además 3 mL de PBS, y se centrifugó durante 7 minutos a 1200 rpm, repitiéndose este proceso una segunda vez. El Pellet obtenido se resuspendió en 200 µL de sacarosa 100 mM. Tras esto, se depositaron 20 µL de las células en suspensión sobre un portaobjetos junto con 400µL de fijador. Éste fue preparado mediante 1% de paraformaldehído Sigma Aldrich, 0,15% de tritón X-100 Sigma-Aldrich, 10 mM de tetraborato de sodio y ajustado a pH 9,2. A continuación, se mezcló la suspensión celular junto con el fijador por toda la superficie del portaobjetos balanceándolos y se dejaron secar parcialmente en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras esto, las preparaciones se lavaron con 0,08% de kodak photo-flo y se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, se almacenaron en PBS con 0,05% de azida a 4°C hasta el momento de usarse.

2. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.

A partir de cruces entre individuos heterocigotos se obtuvieron embriones de 13,5 dpc. Tras esto, se sacrificó a la hembra empleando CO₂ para extraer los embriones del útero, a los que se eliminó la cabeza y las vísceras, tomando parte del material desechado para la extracción de ADN genómico y el posterior genotipado mediante PCR. El resto del embrión se transfirió a un tubo eppendorf con tripsina al 0,25% y se incubó durante 24h

a 4°C. Se transfirieron a una placa de 10 cm de diámetro con medio de cultivo y se incubaron a 37°C. Cuando los embriones alcanzaron el 100% de confluencia, unas 24h después, se tripsinizaron y se transfirieron a una placa de 15 cm de diámetro. Cuando alcanzaron de nuevo la confluencia, se tripsinizaron y se congelaron en medio DMEM con 10% de DMSO y 20% de FBS. Estas células se consideran en pase 0.

3. Genotipado de los embriones de ratón.

El análisis del genotipo de los ratones se realizó mediante PCR. Para extraer el ADN genómico de las muestras obtenidas en el apartado anterior, se incubó cada una de ellas con 600 µL de NaOH a 95°C durante 30 min. Tras esto, se neutralizaron con 50 µL de TRIS (HCl, pH8, 1M), seguido de una centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. Para el genotipado se utilizaron oligonucleótidos que flanqueaban el exón 4, dentro del cual se encuentra la secuencia delecionada en el alelo mutante (5'tccaagcccatggtatcatttt3' y 5'gccccaggataaatccacagta3') (Ver Anexo 1). En las reacciones se utilizaron 5 µmol de dNTPs, 75 pmol de cada oligonucleótido y 1,25U de la Taq ADN polimerasa (Takara) en un volumen final de 25 µl. Las reacciones fueron llevadas a cabo en el interior de un termociclador, en el que se realizaron 35 ciclos de desnaturalización (20 segundos a 94°C), anillamiento (20 segundos a 58°C) y elongación (45 segundos a 72°C). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

4. Cultivos celulares y condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, SIGMA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, GIBCO) y 1% de penicilina/estreptomicina/glutamina (PSG, Gibco). Para subcultivar los MEFs, se eliminó el medio de cultivo y se lavó con 5 mL de PBS al 1X para eliminar los restos de FBS. Tras ello, se empleó 1,5 mL de tripsina al 0,05% (GIBCO), con la finalidad de romper la matriz extracelular y separar los fibroblastos, y se incubaron durante 5 min a 37°C. A continuación, la tripsina fue neutralizada añadiendo 1,5 mL del medio con FBS a cada placa de cultivo. Tras esto, se disgregaron las células de forma mecánica con la pipeta, se contaron y se transfirió el número deseado a otra placa de cultivo.

5. Inmunofluorescencia

Se sembraron MEFs (pase 2-3) en placas de 3,5 cm con cristales cubreobjetos cubiertos con gelatina porcina (0,5%, SIGMA) a una densidad de $1,4 \times 10^5$ células por placa. Las células se incubaron 48 horas.

Una vez fijadas las células con 4% P-formaldehído durante 7 min a 4°C, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (SIGMA) al 0,2% en KB-buffer (20 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% BSA) durante 4 min. Tras un segundo lavado con PBS, las células fueron bloqueadas con FBS al 7% en PBS durante 30 minutos. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) diluido en PBS con 7% de FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS para posteriormente realizar una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, diluido 1:100 en PBS con 7% de FBS. Por último, se realizaron otros tres lavados de 5 minutos con PBS. Las preparaciones se montaron con Vectashield® (Vector Laboratories) y DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindole) para contrastar los núcleos.

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROVEEDOR
Anti-Fosfo-Histona H3 (Ser 10)	Conejo	1:500	MILLIPORE
Anti- α -tubulina	Ratón	1:500	SIGMA-ALDRICH

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia.

RESULTADOS

1. Estudio de la fertilidad masculina en ratones nulos para TRIM37 (TRIM37^{-/-}).

Está descrito que los varones con *mulibrey nanism* son infértiles y presentan hipogonadismo asociado a oligoastenozoospermia o azoospermia [2]. Con el fin de determinar la implicación de TRIM37 en estos procesos decidimos llevar a cabo un estudio de la fertilidad en ratones nulos para esta proteína.

Para comprobar la asociación entre la ausencia de expresión de TRIM37 y el fenotipo testicular descrito, se obtuvieron los testículos de ratones adultos de 2 meses de vida, TRIM37^{+/+} y TRIM37^{-/-}. A simple vista, los testículos procedentes del ratón nulo para TRIM37 tienen un tamaño menor que aquellos extraídos del ratón silvestre (Figura 3). Con el fin de cuantificar la diferencia de tamaño observada, los testículos fueron pesados en una balanza de precisión. Los resultados obtenidos demostraron que el peso de los testículos del ratón con pérdida de función de la proteína era aproximadamente 4 veces más pequeño que el del ratón silvestre, obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 2.

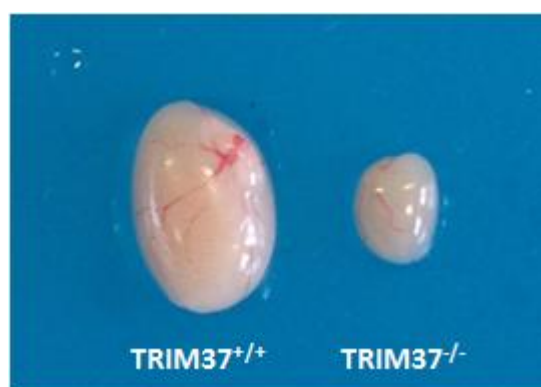


Figura 3. La eliminación de TRIM37 conlleva una reducción del tamaño de los testículos.

<u>GENOTIPO</u>	<u>TIEMPO DE VIDA</u>	<u>PESO (g)</u>
TRIM37 ^{+/+}	2 meses	0,0813
TRIM37 ^{-/-}	2 meses	0,0184

Tabla 2. Estudio comparativo entre dos testículos de ratones de 2 meses de vida, TRIM37^{+/+} y TRIM37^{-/-}.

Los testículos de los ratones descritos anteriormente, se fijaron en Bouin para realizar un estudio histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Como se aprecia en la figura 4, en los cortes histológicos del epidídimo del ratón silvestre, se puede observar la presencia de espermatozoides en el interior de los conductos epididimarios, al contrario que sucede con el ratón nulo para TRIM37, en el que se pone de manifiesto la ausencia total de espermatozoides (Figura 4).

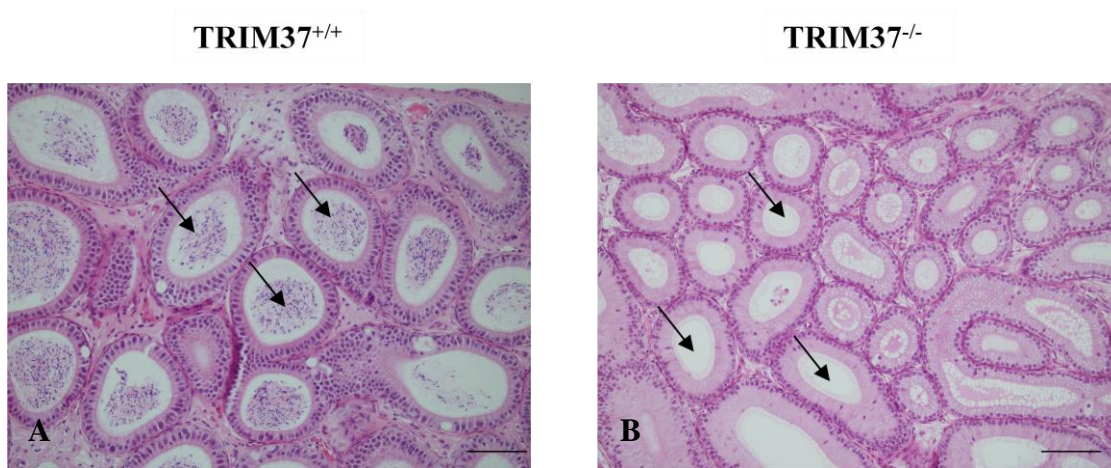


Figura 4. Corte histológico de epidídimo de un ratón silvestre en comparación con un ratón con alelo nulo para TRIM37. La **figura 4A** muestra una sección histológica del epidídimo de un ratón TRIM37^{+/+} de 2 meses de vida, en la que se pueden observar espermatozoides en el interior de los conductos epididimarios (flechas). La **figura 4B** corresponde a un ratón TRIM37^{-/-} en la que se aprecia la ausencia de espermatozoides en el interior de los conductos (flechas). Ambas fotos fueron tomadas empleando el objetivo 20X; la escala utilizada es de 50 μ m.

En los cortes histológicos de testículo, se puede observar que en el ratón TRIM37^{+/+} están presentes todos los estadios celulares desde espermatogonia hasta espermatozoide. Por el contrario, en el ratón TRIM37^{-/-} se aprecia un menor número de espermatogonias y espermatocitos; a pesar de ello, pueden observarse células hasta el estadio de espermatidas alargadas, pero en ningún caso se aprecian espermatozoides. Llama la atención la presencia de túbulos seminíferos degenerados que solo contienen células de Sertoli (fenotipo denominado *Sertoli-cell-only*) (Figura 5).

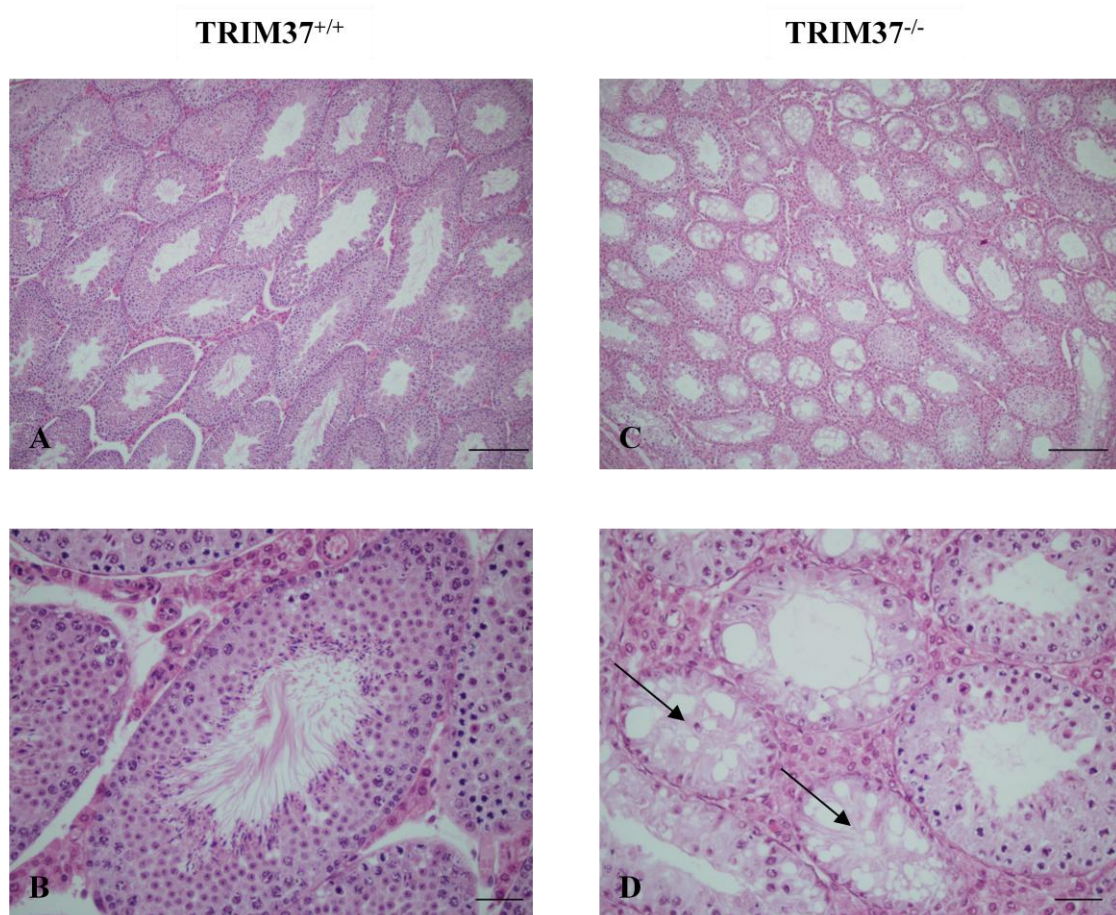


Figura 5. Corte histológico de testículo de un ratón silvestre en comparación con un ratón con alelo nulo para TRIM37. En la **figura 5A** se puede apreciar una sección histológica de testículo de un ratón TRIM37^{+/+}, con un desarrollo normal de la espermatogénesis (Objetivo 10X. Escala: 200μm). La **figura 5B** muestra un plano más ampliado de la imagen anterior, en la que se pueden observar con detalle los distintos estadios de la espermatogénesis (Objetivo 40X. Escala: 20μm). La **figura 5C** corresponde a un corte histológico de un ratón TRIM37^{-/-} (Objetivo 10X. Escala: 200μm). En la **figura 5D** se pueden apreciar, de manera más detallada, algunos túbulos seminíferos correspondientes a la imagen anterior. En este caso, se observa que el ratón TRIM37^{-/-} presenta un menor número de espermatogonias. A pesar de ello, pueden verse células hasta el estadio de espermatida alargada, pero en ningún caso se aprecian espermatozoides. También se muestran algunos túbulos seminíferos que solo contienen células de Sertoli (fenotipo denominado *Sertoli-cell-only*) (flechas). Objetivo 40X. Escala: 20μm.

Con el fin de observar mejor las posibles alteraciones que tienen lugar durante la espermatogénesis de estos ratones decidimos realizar un esparcido de espermatoцитos (*surface spreading*) de los testículos silvestres y mutantes.

Al observar las muestras al microscopio, se aprecia que en el ratón silvestre están presentes células en todos los estadios de la espermatogénesis, desde espermatogonia a espermatozoide. Sin embargo, en el ratón nulo para TRIM37 se observan muy pocos espermatocitos y un escaso número de espermátidas alargadas, presentando éstas cabezas dañadas y aberrantes en comparación con el individuo silvestre (Figura 6); en ningún caso se aprecian espermatozoides.

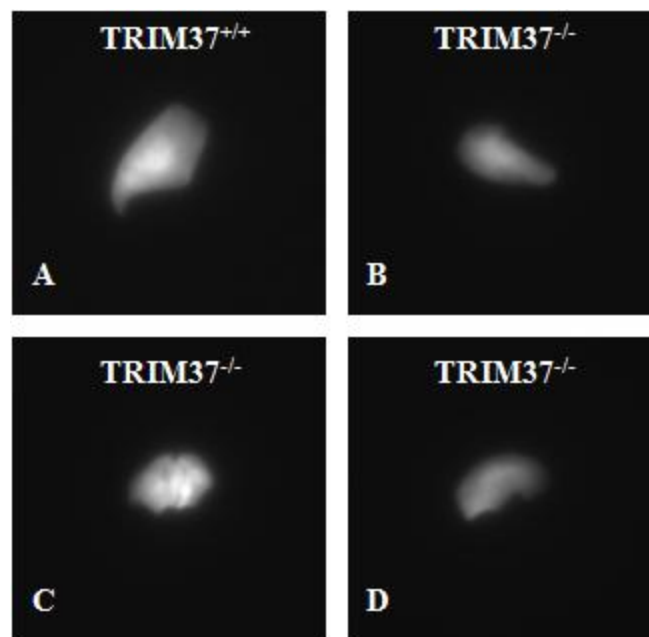


Figura 6. Figura comparativa entre las cabezas de espermátidas de dos ratones, TRIM37^{+/+} y TRIM37^{-/-}. Mediante la técnica del esparcido de espermatozoides se puede observar que en el ratón silvestre las cabezas de espermátidas se encuentran dentro de la normalidad (**Figura 6A**), mientras que en el ratón nulo para TRIM37 se presentan con formas aberrantes (**Figuras 6B, 6C, 6D**).

Dado que la espermatogénesis de los ratones adultos nulos para TRIM37 se encuentra afectada y teniendo en cuenta que el primer ciclo meiótico comienza el día 10 de vida y se prolonga hasta el día 35 (figura 7), se procedió a realizar un segundo estudio con ratones de 18 dpp. El estudio de estos animales nos va a permitir determinar si el estado degenerativo de los testículos se produce como consecuencia de la acumulación crónica de daño en las sucesivas rondas meióticas o bien su origen es previo al inicio de la espermatogénesis.

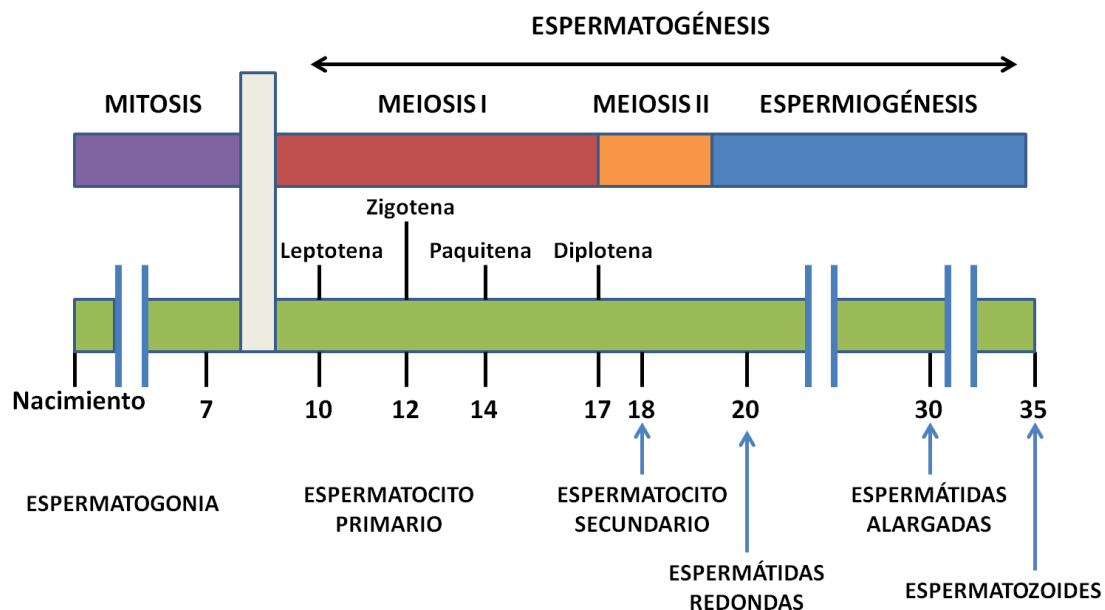


Figura 7. Representación esquemática del proceso de espermatogénesis en el ratón. Durante el periodo embrionario, los gonocitos migran desde la cresta neural a las gónadas, donde se dividen y quedan quiescentes. Entre los días 5 y 10 dpp estos gonocitos se diferencian a espermatogonias, las cuales a partir del día 10 se van a dividir de forma asimétrica generando otra espermatogonia y una célula que entra en meiosis para producir espermatozoides.

Así, se extrajeron los testículos de ratones $TRIM37^{+/+}$ y $TRIM37^{-/-}$ de 18 dpp y se pesaron en una balanza para determinar la diferencia de tamaño. Al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos demostraron que el peso de los testículos del ratón mutante era considerablemente menor, aproximadamente la mitad, que aquellos procedentes del ratón silvestre, obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 3.

<u>GENOTIPO</u>	<u>TIEMPO DE VIDA</u>	<u>PESO (g)</u>
$TRIM37^{+/+}$	18 dpp	0,0168
$TRIM37^{-/-}$	18 dpp	0,0084

Tabla 3. Estudio comparativo entre dos testículos de ratones de 18 dpp, $TRIM37^{+/+}$ y $TRIM37^{-/-}$.

El posterior análisis histológico de estos testículos puso de manifiesto, tal y como se observa en la figura 8, que a 18 ddp, cuando aún se está realizando el primer ciclo meiótico, ya se observa la presencia de algunos túbulos en proceso degenerativo en el individuo $TRIM37^{-/-}$. Además, el número de espermatocitos, en aquellos túbulos que los presentan, es mucho menor que el que se observa en los túbulos del testículo silvestre.

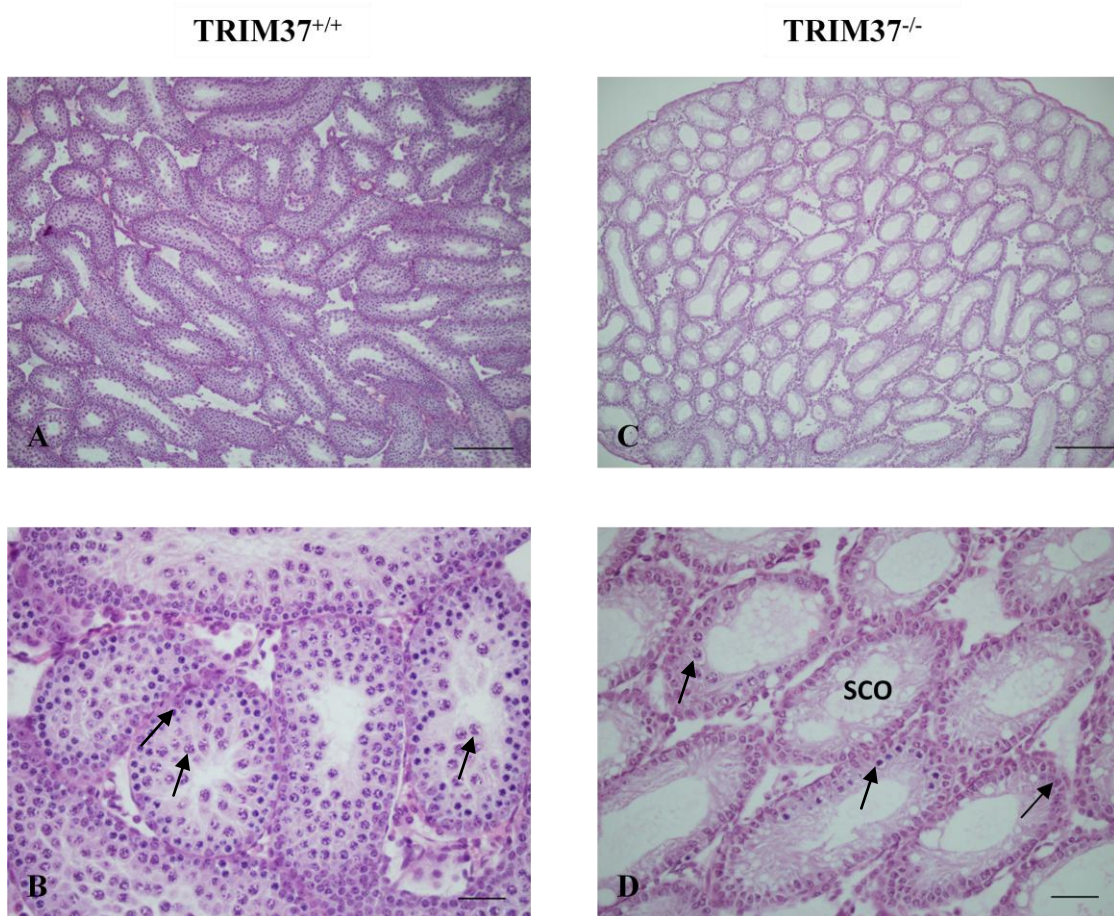


Figura 8. Corte histológico de testículo de dos ratones de 18 dpp, TRIM37^{+/+} y TRIM37^{-/-}. La **figura 8A** muestra un corte histológico de testículo de un ratón silvestre de 18 dpp (Objetivo 10X. Escala: 200µm). La **figura 8B** corresponde a una ampliación de la sección histológica anterior, en la que se observa el primer ciclo de elaboración de espermatozoides, pudiendo hallarse células de la espermatogénesis hasta el estadio de espermatocito (flechas) (Objetivo 40X. Escala: 20µm). La **figura 8C** pertenece a un corte histológico de un ratón con alelo nulo para TRIM37 (Objetivo 10X. Escala: 200µm). De una manera más ampliada, la **figura 8D** muestra un menor número de espermatogonias y espermatocitos (flechas) con respecto al ratón silvestre y, además, pueden apreciarse algunos túbulos seminíferos que presentan un fenotipo *Sertoli-cell-only* (SCO) (Objetivo 40X. Escala: 20µm).

2. Determinación de la posible implicación de TRIM37 en el correcto desarrollo de la mitosis celular, mediante el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón.

Estudios llevados a cabo en líneas celulares humanas, sugieren que TRIM37 podría estar implicado en el correcto desarrollo de la mitosis celular [5]. Con el fin de comprobar la implicación in vivo de TRIM37 en el correcto desarrollo de esta fase del ciclo celular, decidimos utilizar fibroblastos embrionarios de ratones nulos para TRIM37.

A partir del cruce entre dos ratones heterocigotos, se obtuvieron cinco embriones a los 13,5 dpc. Posteriormente, se tomaron muestras de ADN de cada uno de ellos y se procedió a realizar el genotipado mediante PCR (Figura 9).

A cada uno de los embriones se los denominó como 1A, 2A, 3A, 4A y 5A, y el genotipo resultante fue el siguiente: TRIM37^{+/-} (1A), TRIM37^{-/-} (2A), TRIM37^{-/-} (3A), TRIM37^{+/-} (4A), TRIM37^{-/-} (5A).

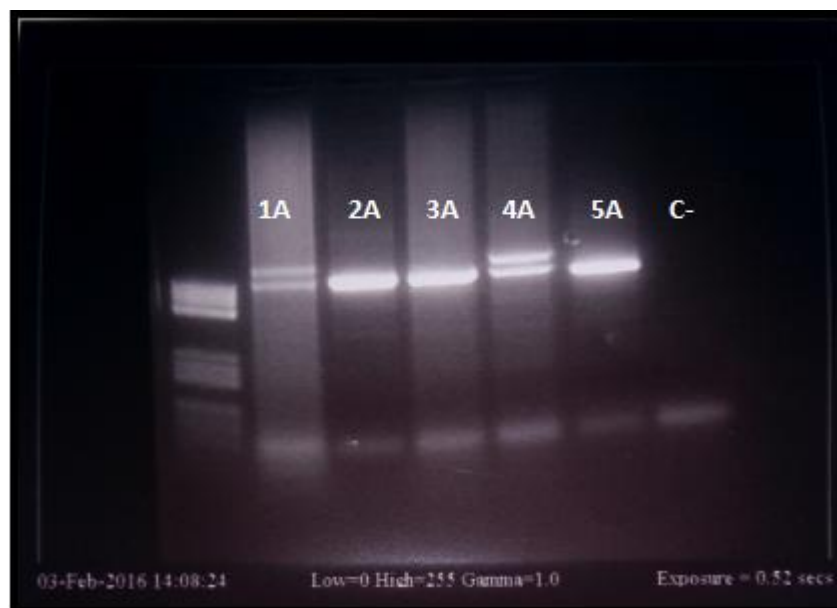


Figura 9. Genotipado de ratones mediante PCR. En la imagen se muestra el genotipo de los cinco embriones: 1A (TRIM37^{+/-}), 2A (TRIM37^{-/-}), 3A (TRIM37^{-/-}), 4A (TRIM37^{+/-}) y 5A (TRIM37^{-/-}). C- corresponde al control negativo.

A partir de estos embriones, se obtuvieron fibroblastos que fueron cultivados y se utilizaron para realizar una inmunofluorescencia, frente a la proteína α -tubulina y a la histona H3 fosforilada en serina 10 (PH-3). El anticuerpo anti- α -tubulina es capaz de fijarse a los haces de tubulina que conforman el huso acromático en las células en mitosis, por lo que permite distinguir la presencia de husos bipolares de multipolares en esta fase del ciclo celular (Figura 10). Por otro lado, PH-3 es un anticuerpo que marca la histona H3 fosforilada, indicando con ello que la célula ha entrado en la fase G2 del ciclo celular, y presenta su máxima expresión en mitosis, de manera que permite distinguir si una célula se encuentra en una u otra fase del ciclo celular (Figura 11).

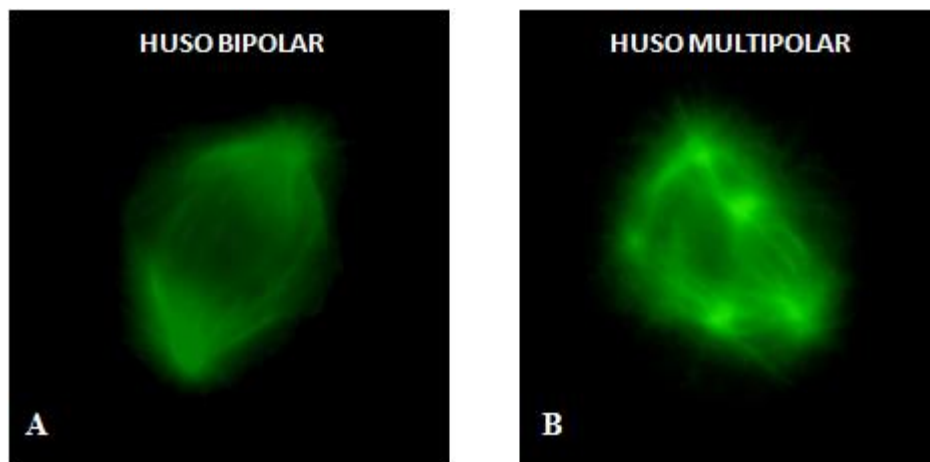


Figura 10. Células en mitosis visualizadas con inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti- α -tubulina. (A) Mitosis correcta, en la que se puede observar el huso acromático bipolar. (B) Mitosis aberrante, en la que aparece un huso multipolar.

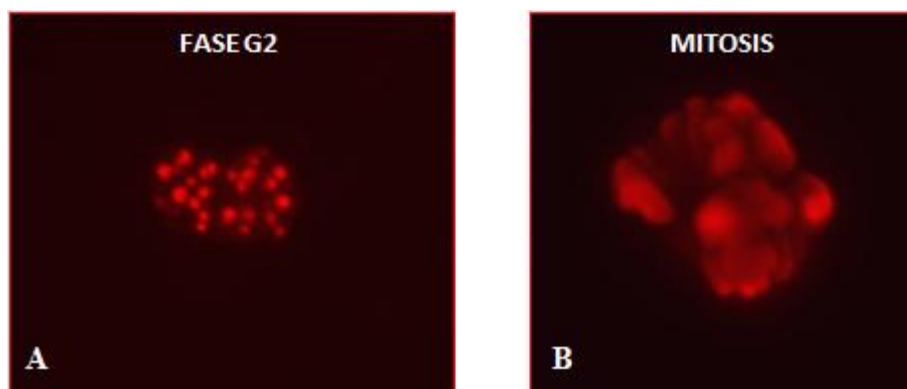


Figura 11. Inmunofluorescencia con pH-3. (A) Célula en fase G2. (B) Célula en fase M.

Empleando un microscopio, se hizo una búsqueda de 100 células en mitosis de cada una de las preparaciones y se realizó un recuento separando las que presentaban husos bipolares de aquellas que contenían husos multipolares gracias al estudio de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti- α -tubulina. Como puede observarse en la figura 12, el número de husos multipolares encontrados en los MEFs de ratones nulos para TRIM37 es mucho mayor que los presentados por los ratones heterocigotos (45% y 17% respectivamente).

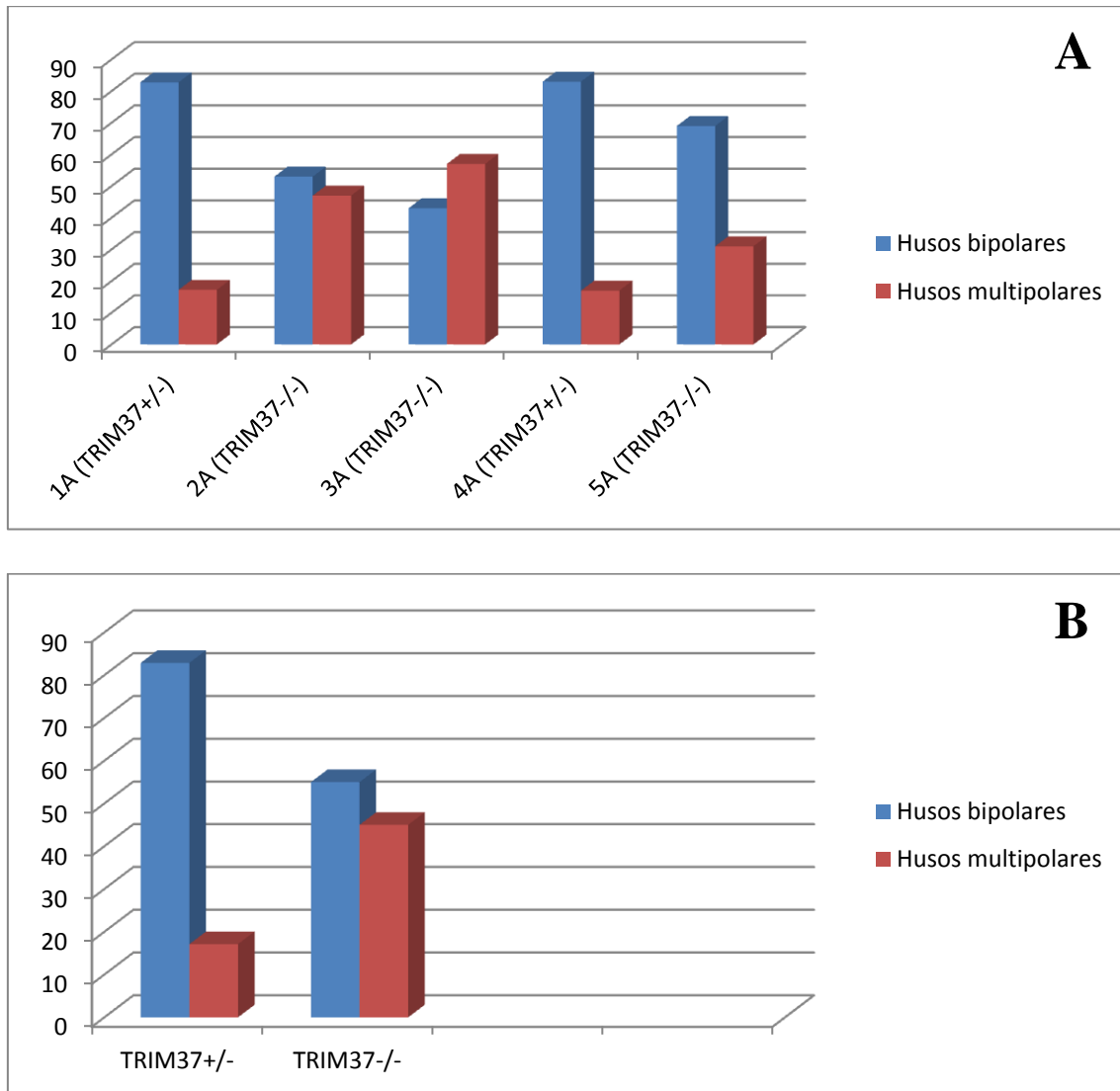


Figura 12. (A) Representación gráfica de los husos bipolares y multipolares en cada una de las preparaciones de fibroblastos embrionarios de ratón. (1A) 82,76% de husos bipolares y 17,24% de husos multipolares. (2A) 53% de husos bipolares y 47% de husos multipolares. (3A) 43% de husos bipolares y 57% de husos multipolares. (4A) 83% de husos bipolares y 17% de husos multipolares. (5A) 69% de husos bipolares y 31% de husos multipolares. (B) Representación gráfica de la media aritmética de los valores anteriores. Los ratones TRIM37^{+/-} presentan un 82,88% de husos bipolares y 17,12% de husos multipolares. En cambio, los ratones TRIM37^{-/-} presentan un 55% de husos bipolares y 45% de husos multipolares.

Para determinar posibles diferencias en la entrada/salida de mitosis entre ambos genotipos, se tomaron 10 fotografías de varios campos de cada preparación, realizadas al azar. De cada una de ellas se hizo un recuento de las células presentes en estadio G2 y en fase M. Para ello, se procedió a contar los núcleos de todas las células del campo correspondiente teñidas con DAPI; entre ellas, se realizó un recuento de células en fase G2 y M, que podían distinguirse por la intensidad de marcaje que expresaba el anticuerpo PH-3, hallándose posteriormente el porcentaje de ambas respecto al total de núcleos contados. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13, en la que se puede observar que no existen diferencias significativas entre los ratones TRIM37^{+/-} y TRIM37^{-/-}.

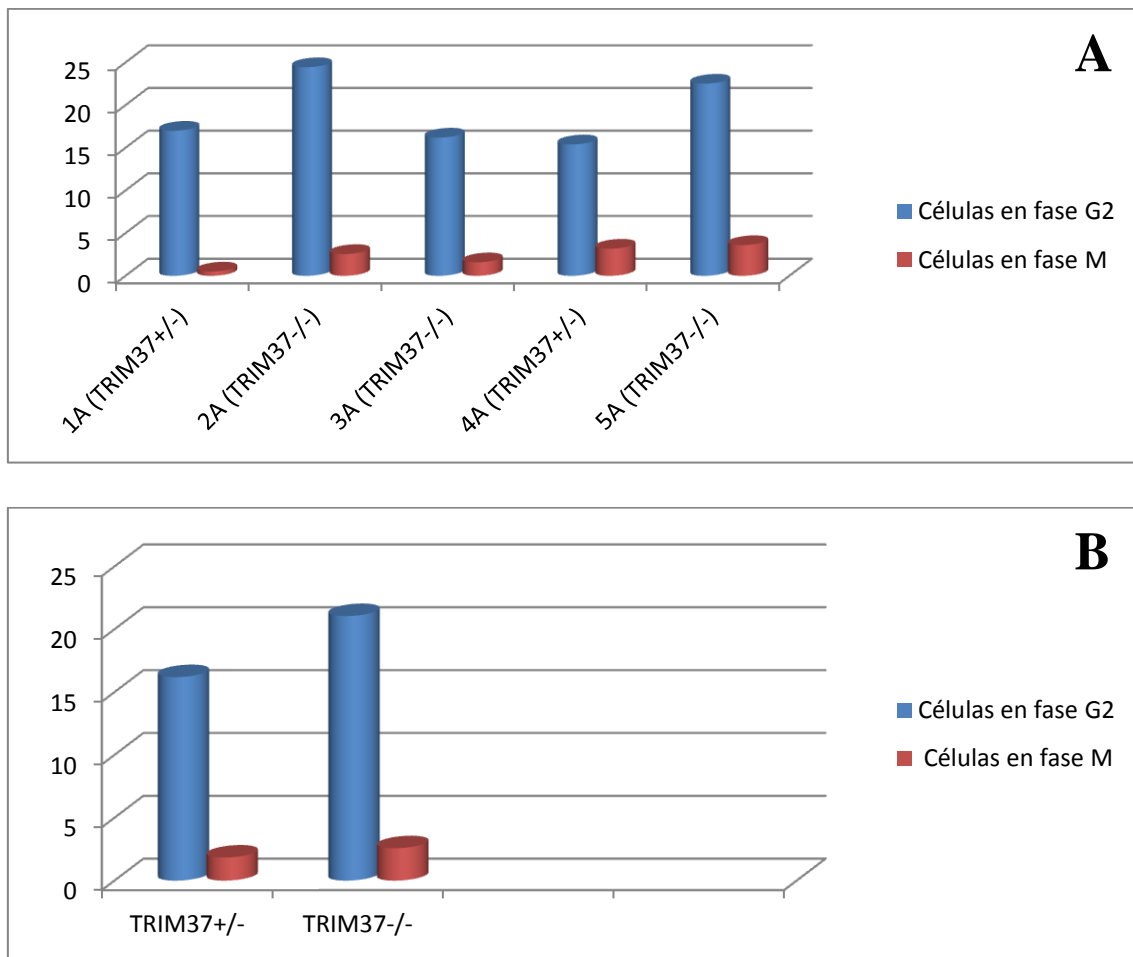


Figura 13. (A) Representación gráfica de las células en fase G2 y M en cada una de las preparaciones. (1A) 17% de células en fase G2 y 0,5% de células en fase M. (2A) 24,45% de células en fase G2 y 2,55% de células en fase M. (3A) 16,2% de células en fase G2 y 1,58% de células en fase M. (4A) 15,4% de células en fase G2 y 3,18% de células en fase M. (5A) 22,52% de células en fase G2 y 3,6% de células en fase M. (B) Representación gráfica de la media aritmética de los valores anteriores. Los ratones TRIM37^{+/-} presentan un 16,2% de células en fase G2 y 1,84% de células en fase M. En cambio, los ratones TRIM37^{-/-} presentan un 21,06% de células en fase G2 y 2,58% de células en fase M.

DISCUSIÓN

1. Estudio de la fertilidad masculina en ratones nulos para TRIM37 (TRIM37^{-/-}).

Estudios realizados en pacientes con *mulibrey nanism* sugieren que la pérdida de función de TRIM37 podría ser la causante del fenotipo patológico descrito en estos pacientes, incluido el desarrollo de infertilidad [1,2,7]. Con el fin de determinar cuál es la función que desempeña TRIM37 en la fertilidad masculina, se ha generado un modelo de ratón nulo para esta proteína (TRIM37^{-/-}).

Empleando este modelo murino, se ha evaluado la maduración sexual y la función testicular de dos ratones TRIM37^{-/-}, de 2 meses y 18 dpp, en comparación con dos controles TRIM37^{+/+} del mismo tiempo de vida.

Los resultados obtenidos han demostrado que la ausencia de TRIM37 produce en los ratones hipoplasia testicular, tal y como ocurre en los pacientes con *mulibrey nanism* (tablas 2 y 3). Por otra parte, el estudio histológico ha puesto de manifiesto que estos ratones TRIM37^{-/-} son infértiles por azoospermia. Los testículos muestran una ausencia total de espermatozoides y un menor número de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas alargadas, así como túbulos seminíferos degenerados que solo contienen células de Sertoli (figura 5). De la misma forma, en el ratón TRIM37^{-/-} de 18 dpp ya se observa un menor número de espermatogonias y espermatocitos con respecto al control TRIM37^{+/+} y, al igual que el ratón de 2 meses, algunos de sus túbulos seminíferos estaban degenerados, presentando un fenotipo *Sertoly-cell-only* (figura 8). Puesto que a esta edad los ratones aun no han finalizado su primer ciclo meiotico, la degeneración testicular observada no se produce como consecuencia de la acumulación crónica de daño en las sucesivas rondas meióticas, sino que debe tener su origen en un estadio previo al inicio de la meiosis.

Poniendo estos datos en conjunto, se derivan tres posibles teorías para explicar este proceso degenerativo: (1) Que los gonocitos no realicen una migración correcta desde la cresta neural a la gónada (esto ocurre en el embrión entre E8,5 a E13,5); (2) Que los gonocitos no se diferencien adecuadamente a espermatogonias (entre los días P3 y P5); (3) Que la división y/o mantenimiento de las espermatogonias no se realice de manera correcta. También cabe la posibilidad de que el fallo en la espermatogénesis se deba a una combinación de las teorías anteriores.

Por otra parte, se ha observado que el ratón TRIM37^{-/-} de 2 meses a pesar de presentar un menor número de espermatogonias, éstas son capaces de desarrollarse hasta el estadio de espermatida alargada. Sin embargo, en ningún caso se aprecian espermatozoides. Esto pone de manifiesto la posibilidad de una segunda función de TRIM37 en el desarrollo de la espermatogénesis, en concreto en la etapa de espermiogénesis. Además, la presencia de espermatidas alargadas con cabezas aberrantes, observadas con la técnica del esparcido de espermatocitos, apoyan esta teoría, pues es posible que la ausencia de TRIM37 pudiera ser la responsable de que dichas espermatidas adquirieran estas formas aberrantes y no sean capaces de diferenciarse a espermatozoides durante la espermiogénesis.

Todos estos resultados en conjunto, sugieren que TRIM37 podría tener un importante papel en el desarrollo correcto de la fertilidad en mamíferos y que su ausencia podría ser la causa del desarrollo de un fallo en la espermatogénesis posiblemente antes de la iniciación de la meiosis y en el desarrollo de la espermiogénesis. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios al respecto que permitan definir el mecanismo de acción exacto de esta proteína en relación con la fertilidad.

2. Determinación de la posible implicación de TRIM37 en el correcto desarrollo de la mitosis celular, mediante el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón.

Estudios realizados en líneas celulares humanas han puesto de manifiesto que TRIM37 podría estar implicado en el correcto desarrollo de la mitosis celular [5]. Para estudiar, la posible implicación de TRIM37 en este proceso, decidimos abordar el estudio del ciclo celular de fibroblastos embrionarios de ratón TRIM37^{-/-}.

A partir del cruce entre dos ratones heterocigotos se obtuvieron cinco embriones con genotipos TRIM37^{+/-} y TRIM37^{-/-}. Como en la camada no se desarrolló ningún ratón silvestre, decidimos emplear como controles los MEFs heterocigotos, presuponiendo que éstos tendrían un fenotipo similar al silvestre.

El estudio de la formación del huso acromático en las mitosis celulares de los MEFs, puso de manifiesto que las células nulas para TRIM37 presentaban un mayor número de husos multipolares en relación con las heterocigotas (45% frente a 17%).

Por otra parte, no parece que la aparición de estos husos poliastrales afecte a la entrada, salida o duración de las mitosis de estos MEFs, ya que la cuantificación del número de células que se encuentran en fase G2 y fase M en cada uno de los embriones estudiados no presentó diferencias significativas.

Estos datos en conjunto, ponen de manifiesto que TRIM37 podría estar implicado en la correcta formación del huso acromático durante la división celular, de manera que su ausencia podría promover la aparición de estos husos multipolares. Esto podría desencadenar un anormal reparto de cromosomas en las células hijas, generando como consecuencia células aneuploides. Dado que la aneuploidía es una característica distintiva de la mayoría de los tumores sólidos [13], es posible que la ausencia de TRIM37 pueda ser una de las causas de la mayor susceptibilidad tumoral que presentan los pacientes con *mulibrey nanism*. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para valorar si estas células con husos poliastrales son eliminadas por apoptosis o, por el contrario, finalizan la mitosis generando células hijas aneuploides, que podrían favorecer un posible desarrollo tumoral, confirmando la hipótesis realizada anteriormente.

Por otra parte, el hecho de que los MEFs heterocigotos presentasen una cantidad anormalmente elevada de husos multipolares, sugiere que posiblemente éstas células sean haploinsuficientes, es decir, un solo alelo del gen TRIM37 no sería suficiente para generar suficiente proteína para realizar correctamente todas las funciones que desempeña. Por tanto, en este caso es posible que la haploinsuficiencia se manifieste mediante un fenotipo menos penetrante (menor número de husos multipolares) que en el caso de los MEFs nulos para TRIM37. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios al respecto para comprobar este hecho.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada, se derivan las siguientes conclusiones:

1. La ausencia de la proteína TRIM37 provoca esterilidad en los ratones macho por azoospermia.
2. TRIM37 es necesaria para una correcta espermiogénesis en el ratón.
3. TRIM37 parece estar implicada en la proliferación y/o mantenimiento de las espermatogonias.
4. La ausencia de TRIM37 promueve la formación de husos poliastrales en MEFs.
5. TRIM37 podrían presentar una posible haploinsuficiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. N Karlberg, H Jalanko, J Perheentupa, M Lipsanen-Nyman. Mulibrey nanism: Clinical features and diagnostic criteria. *J Med Genet.* 2004; 41: 92-98.
2. Susann Karlberg, Jorma Toppari, Niklas Karlberg, Mirja Nurmio, Riitta Karikoski, Hannu Jalanko et al. Testicular Failure and Male Infertility in the Monogenic Mulibrey Nanism Disorder. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: 3399–3407.
3. Matthias Kumpf, Riikka H. Hämäläinen, Michael Hofbeck, Winfried Baden. Refractory congestive heart failure following delayed pericardectomy in a 12-year-old child with Mulibrey nanism due to a novel mutation in TRIM37. *Eur J Pediatr.* 2013; 172: 1415-1418.
4. Niklas Karlberg, Susann Karlberg, Riitta Karikoski, Sakari Mikkola, Marita Lipsanen-Nyman and Hannu Jalanko. High frequency of tumours in Mulibrey nanism. *J Pathol.* 2009; 218: 163–171.
5. Fernando R. Balestra, Petr Strnad, Isabelle Flückiger, and Pierre Gönczy. Discovering Regulators of Centriole Biogenesis through siRNA-Based Functional Genomics in Human Cells. 2013; 25: 555-571.
6. Hämäläinen RH, Joensuu T, Kallijärvi J, Lehesjoki AE. Characterization of the mulibrey nanism -associated *TRIM37* gene: transcription initiation, promoter region and alternative splicing. *Gene.* 2006; 366(1):180-8.
7. Susann Karlberg, Aila Tiitinen, Marita Lipsanen-Nyman. Failure of Sexual Maturation in Mulibrey Nanism. *N ENGL J MED.* 2004; 351: 2559-2560.
8. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 2001; 20:2140-2151.

9. Sanchita Bhatnagar^{1,2}, Claude Gazin³, Lynn Chamberlain^{1,2}, Jianhong Ou², Xiaochun Zhu^{1,2}, Jogender S. Tushir et al. TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. *Nature*. 2014; 516: 116-120
10. John H. Richburg, Jessica L. Myers, Shawn B. Bratton. The role of E3 ligases in the ubiquitin-dependent regulation of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014. 30: 27–35.
11. Sandrine Caburet, Valerie A. Arboleda, Elena Llano, Paul A. Overbeek, Jose Luis Barbero, Kazuhiro Oka et al. Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *N ENGL J MED*. 2014; 370: 943-949.
12. Elena Llano, Laura Gomez-H, Ignacio García-Tuñón, Manuel Sánchez-Martín, Sandrine Caburet, Jose Luis Barbero et al. STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: 3421-31.
13. David J. Gordon, Benjamin Resio, David Pellman. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet*. 2012; 13: 189-203.

ANEXO 1

Para desarrollar un modelo de ratón $TRIM37^{-/-}$, se empleó una herramienta de ingeniería genética, conocida con el nombre de CRISPR/CAS9. Este sistema permite la edición del genoma diana mediante la actuación de una endonucleasa CAS9 y sgRNA complementario a 20 pb del ADN diana, que servirá como guía de la endonucleasa para actuar de manera precisa en el lugar de edición.

El desarrollo de ratones nulos para $TRIM37$ se llevó a cabo mediante una microinyección en zigotos de los componentes del sistema CRISPR/CAS9 y la posterior transferencia de los mismos a hembras pseudopreñadas. De esta manera, se obtuvieron ratones fundadores heterocigotos, que se pusieron en cruce para obtener las líneas definitivas del modelo deseado.

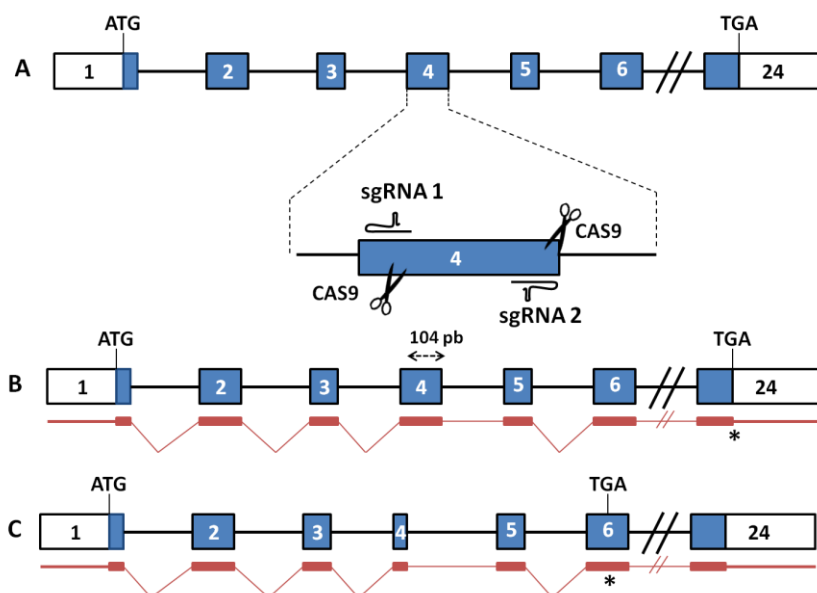


Figura suplementaria 1. Representación esquemática del desarrollo de un modelo de ratón $TRIM37^{-/-}$. **(A)** Representación esquemática del gen $TRIM37$ con sus intrones y exones. **(B)** Representación esquemática del alelo silvestre de $TRIM37$ (esquema superior) y de su transcrito a RNA mensajero (esquema inferior). Se observa que el exón 1 y 24 presentan una región 5'UTR y 3'UTR respectivamente (color blanco). El inicio de la traducción lo marca el triplete de nucleótidos ATG, mientras que su terminación está determinada por el codón TGA. Así, se puede observar que en el gen silvestre $TRIM37$ la traducción a proteína comienza en el exón 1 y finaliza en el exón 24 (asterisco). **(C)** Representación esquemática del gen $TRIM37$ editado por CRISPR/CAS9 (esquema superior) y su transcrito a RNA mensajero (esquema inferior). Se observa que en el exón 4 se ha producido una deleción de 104 pb. Esto ha dado lugar a un cambio en la secuencia de nucleótidos alterando los codones originales y generando un codón de terminación prematuro TGA en el exón 6 (asterisco), que tiene como consecuencia la generación de una proteína trunca

Como se observa en la *figura suplementaria 1*, el gen TRIM37 está compuesto por 24 exones. De ellos, el lugar elegido para la actuación de los componentes del sistema CRISPR/CAS9 fue el exón 4, lugar donde se generó una delección de 104 pb mediante la actuación de una nucleasa CAS9 y dos sgRNA (sgRNA1 y sgRNA2) que actuarían como guías en la edición del genoma. Esta delección del DNA diana dio lugar a un cambio en la secuencia de los tripletes de nucleótidos que tuvo como consecuencia la generación de un codón de terminación en el exón 6, generando una proteína truncada.